

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. P. Klein

**DER EINFLUSS VON ASTA 5122 AUF DIE
ZELLULÄRE ANTI-BAKTERIELLE IMMUNITÄT IM
LISTERIOSE-MODELL DER MAUS**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Barbara Weber, geb. Beden
aus Mainz-Kastel

Mainz 1975

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. P. Klein

**DER EINFLUSS VON ASTA 5122 AUF DIE
ZELLULÄRE ANTI-BAKTERIELLE IMMUNITÄT IM
LISTERIOSE-MODELL DER MAUS**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Barbara Weber, geb. Beden
aus Mainz-Kastel

Mainz 1975



Fachbereichsdekan: Professor Dr. P. Klein

Referent: Professor Dr. H. Hahn

Korreferent: Professor Dr. E.-M. Lemmel

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
A) <u>Einleitung</u>	1
B) <u>Engere Problemstellung</u>	6
1. Asta 5122, eine neue immusuppressive Substanz	6
2. Das Listeriose-Modell der Maus	7
3. Ziel der Arbeit	7
C) <u>Materialien und Methoden</u>	9
1. Materialien	9
1.1. Testsubstanz	9
1.2. Medium	9
1.3. Nährböden	10
1.4. Bakterien	10
1.5. Tiere	10
1.6. Geräte	10
2. Methoden	11
2.1. Bestimmung des Infektionsverlaufes	11
2.1.1. Infektion	11
2.1.2. Bestimmung der Keimzahlen in der Leber und Milz	11
2.2. Die passive Übertragung von Anti- Listerien-Immunität	12
2.2.1. Gewinnung von Milzzellen aus Listeria-immunen Mäusen	12
2.2.2. Messung der passiv übertragenen Immunität	12
2.3. Messung der allergischen Reaktion vom Spättyp	13
2.3.1. Herstellung des Listeria-Antigens	13
2.3.2. Nachweis der verzögerten aller- gischen Reaktion	13

D) <u>Ergebnisse</u>	14
I. Aufbau des Testsystems	14
1. Verlauf einer Erstinfektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> bei der normalen Maus	14
2. Die passive Übertragung der Anti- <i>Listerien</i> -Immunität durch lymphoide Milzzellen aus <i>Listeria</i> -immunem Spendern	15
II. Versuche zur Wirkung von Asta 5122	17
1. Einfluß von Asta 5122 auf die Entwicklung der aktiven Anti- <i>Listerien</i> -Immunität	17
1.1. Bei simultaner Gabe mit der Infektion	17
1.2. Bei Gabe während der ersten zwei Tage der Infektion	18
1.3. Bei Gabe zu verschiedenen Zeiten vor der Infektion	19
1.3.1. Bei Gabe 24 bzw. 48 Stunden vor Infektionsbeginn	19
1.3.2. Bei Gabe sieben Tage vor Infektionsbeginn	20
1.4. Zusammenfassende Darstellung an Hand eines Immunsuppressions-Index	21
2. Einfluß von Asta 5122 auf die passiv übertragene Anti- <i>Listerien</i> -Immunität	22
2.1. Einfluß von Asta 5122 auf die lymphozytäre Komponente	22
2.2. Einfluß von Asta 5122 auf die phagozytäre Komponente der Anti- <i>Listerien</i> -Immunität	24
2.2.1. Behandlung der Empfänger zum Zeitpunkt der passiven Zellular-Immunisierung und Infektion	24
2.2.2. Behandlung der Empfänger 24 bzw. 48 Stunden vor passiver Zellular-Immunisierung und Infektion	26

3. Einfluß von Asta 5122 auf die passiv erworbene Allergie vom verzögerten Typ	28
3.1. Prüfung der Wirksamkeit des verwendeten Antigens	28
3.2. Verminderung der passiv übertragenen allergischen Spätreaktion durch Asta 5122	29
E) <u>Diskussion</u>	31
F) <u>Zusammenfassung</u>	37
G) <u>Literaturverzeichnis</u>	38



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A) Einleitung

Immunsuppressive Substanzen bewirken eine Herabsetzung der Immunleistung des Organismus. Der immunsuppressive Effekt wird durch eine Schädigung der Zellen des Immunapparates erzielt. In der Klinik finden Immunsuppressiva dort Anwendung, wo es darauf ankommt, die Immunantwort oder die Folgen von Immunreaktionen zu unterdrücken. Die Indikation dazu ergibt sich dann, wenn die Folgen einer Immunreaktion bzw. -antwort für den Organismus schädlich sind. So werden Immunsuppressiva beispielsweise angewandt, um die Überlebenszeit eines Organtransplantates zu verlängern. Auch bei Autoimmunkrankheiten verschiedener Genese oder bei allergischen Hauterkrankungen werden Immunsuppressiva auf breiter Basis eingesetzt (34, 5).

Immunsuppression ist seit mehr als fünfzig Jahren bekannt. 1921 beschrieb Hektoen (34) die immunsuppressive Wirkung von Benzol und Toluol, sowie von Stickstoff-Lost-Verbindungen. Die ersten Versuche zur klinischen Nutzung dieses Prinzips liegen jedoch nicht länger als zwanzig Jahre zurück: Damals wurden erste Versuche einer Therapie des Lupus erythematodes disseminatus und der hämolytischen Anämie mit Stickstoff-Lost angestellt (34). Ein großer Nachteil dieser ersten Therapie-Versuche war die hohe Toxizität des Stickstoff-Lost. 1960 wurde von Dameshek und Schwartz (41) erstmals 6-Mercaptopurin bei Lupus erythematodes und anderen Immunopathien eingesetzt. Das Toxizitätsrisiko bei immunsuppressiver Therapie konnte im Lauf der Jahre durch Verbesserung oder Neuentwicklung von Immunsuppressiva verringert werden. Dennoch besteht nach wie vor die Notwendigkeit einer Suche nach besseren Substanzen, und die bisher gewonnenen Teilerfolge haben gezeigt, daß systematische Forschungsarbeit auf diesem Gebiet zu einer Verbreiterung und Differenzierung der therapeutischen Möglichkeiten führen kann.

Es sind heute verschiedene Typen von Immunsuppressiva bzw. Zytostatika bekannt, die sich nicht nur durch ihre chemische Zusammensetzung, sondern auch durch ihren Wirkungsmechanismus unterscheiden. Tabelle 1 faßt die typischen Vertreter der verschiedenen Gruppen immunsuppressiver Substanzen zusammen.

Tab. 1: Gruppen der immunsuppressiv wirksamen Substanzen
(38, 41, 13)

I. Alkylantien

Stickstoff-Lost-Derivate:

Cyclophosphamid

Chlorambucil

Äthylenimine:

Tetramin

Methylsulfonsäurederivate:

Busulfan

III. Pflanzen-Alkaloide

Vinca rosea:

Vinblastin

Vincristin

Podophyllin

II. Antimetaboliten

Folsäure-Antagonisten:

Methotrexat

Aminopterin

Purin-Antagonisten:

6-Mercaptopurin

Azathioprin

Pyrimidin-Antagonisten:

5-Fluor-Uracil

Cytosin-Arabinosid

IV. Antibiotika

Mitomycin C

Aktinomycin D

Puromycin

Azaserin

Daunomycin

Bezüglich des Wirkungsmechanismus besteht eine Vielfalt von Möglichkeiten, in die Funktion der Zellen einzugreifen. Es sollen im folgenden aber nur zwei Gruppen von wirksamen Substanzen näher diskutiert werden, da diese besonders gut erforscht sind.

Alkylantien, zum Beispiel Cyclophosphamid, greifen an mehreren Stellen in den Zellstoffwechsel ein, indem sie labile Alkylreste auf Nukleinsäuren oder Proteinmoleküle übertragen. Die daraus resultierende Molekülvernetzung stört unter anderem die DNS-Replikation und auch die Proteinbiosynthese. Es ergibt sich aus diesen Wirkungen eine allgemeine Zytotoxizität, die unabhängig von einem bestimmten Stadium des Zellzyklus ist.

Im Gegensatz dazu wirken Antimetaboliten wie Folsäure- und Purin-Antagonisten überwiegend antiproliferativ. Sie blockieren die zur Zellteilung notwendigen Syntheseprozesse, indem sie mit physiologischen Substraten an Enzymproteinen konkurrieren (40, 39). Lemmel, Hurd und Ziff (22) haben erstmals streng unterschieden zwischen antiproliferativ und zytotoxisch wirksamen Substanzen, indem sie bei ihren Untersuchungen über den Angriffspunkt von 6-Mercaptopurin und Cyclophosphamid die Neubildungsrate der einzelnen Zelltypen des peripheren Blutbildes berücksichtigt haben. Experimente mit radioaktiv markiertem H^3 -Thymidin ließen die Proliferationskinetik der verschiedenen Zellpopulationen erkennen: Polymorphkernige Granulozyten und große mononukleäre Zellen gehören bei der Maus zu den kurzlebigen Zellen, kleine und mittlere Zellen zu den langlebigen.

Substanzen, die über eine Hemmung der Zellneubildung wirken, führen zu einer Verarmung an kurzlebigen Zellen; Substanzen, die das periphere Blutbild durch eine zytotoxische Wirkung beeinflussen, führen zu einer Verminderung der langlebigen Zellpopulationen, während die Zahl der kurzlebigen Zellen durch rasche Proliferation im Knochenmark schnell wieder ergänzt werden kann (4). Da die kleinen und mittleren Lymphozyten die Träger der spezifischen Immunantwort sind (14, 15, 32, 49), muß jede Immunsuppression bezwecken, diese Zelltypen zu reduzieren oder funktionell auszuschalten. Bei immunologisch unspezifischen Reaktionen sind demgegenüber vorwiegend Granulozyten und große mononukleäre Zellen beteiligt. Demzufolge kann eine Substanz nur dann im eigentlichen Sinn immunsuppressiv wirksam sein, wenn sie mit

einer allgemeinen peripheren Zytotoxizität auch die langlebigen immunkompetenten Zellen trifft; eine antiproliferativ wirksame Substanz kann dagegen nur die Folgereaktionen nach stattgehabter Immunantwort beeinflussen (3).

Die praktischen Nachteile bei der Verwendung von Immunsuppressiva ergeben sich aus der Schädigung des gesamten Immunapparates, d. h. dem Mangel an Selektivität. In der Tat hat die klinische Erfahrung gezeigt (13, 34, 41), daß die durch die Anwendung immunsuppressiver Substanzen bedingte Reduktion von immunkompetenten Zellen des B- als auch des T-Systems zu einer allgemeinen Herabsetzung der immunologisch induzierten Abwehrleistung des Organismus führt (42).

Die Tatsache, daß ein Immunsuppressivum die Bildung spezifischer Antikörper beeinträchtigt, führt die Gefahr herauf, daß der Patient eine für die Abwehr von Eitererregern erforderliche Abwehrpotenz nicht mehr aufbauen kann. Interkurrente eitrige Infektionen sind bei manchen immunsuppressiv behandelten Patienten so häufig, daß erst die breite Anwendung von Antibiotika eine immunsuppressive Therapie ermöglicht (12).

In nicht minder großem Ausmaß besteht jedoch auch das Risiko von Infektionen mit solchen Krankheitserregern, die durch T-Zell-induzierte Immunreaktionen bekämpft werden, d. h. Krankheitserregern, welche chronische Infektionen hervorrufen (42, 35). Hierzu rechnet man die Erreger der Tuberkulose und Lepra, Pilze, Viren und eine Reihe von Nematoden und Helminthen (11, 37).

Die geschilderten Gefahren der immunsuppressiven Therapie machen es notwendig, weiterhin nach neuen Substanzen zu suchen. Das Ziel muß dabei sein, Substanzen höherer Selektivität zu entwickeln, d. h. solche Substanzen, welche die unerwünschten Seiteneffekte in weniger ausgeprägtem Maße besitzen und dem Organismus die Fähigkeit zu einer gewissen Minimalabwehr belassen (20). Daher wird bei der Entwicklung von neuen Immunsuppressiva gerade auch der mög-

lichen Schädigung des antiinfektiösen Abwehrapparates als einer unangenehmen Nebenwirkung größere Beachtung geschenkt werden müssen.

B) Engere Problemstellung

1. Asta 5122, eine neue immunsuppressive Substanz

Asta 5122 ist eine Neuentwicklung der Asta-Werke, die sich derzeit im tierexperimentellen Stadium befindet. Chemisch handelt es sich um ein bisubstituiertes Oxazaphosphorin-Derivat, das sich vom Ifosphamid bzw. Cyclophosphamid herleiten läßt (8, 9).

Erste Ergebnisse über die Wirkung dieser Substanz wurden 1972 und 1973 von Potel et al. (36) und Lemmel (23) mitgeteilt. Die bisherigen Befunde zum Wirkungsmechanismus von Asta 5122 haben ergeben, daß sowohl die Ausbildung der humoralen, als auch die Ausbildung der zellulären Immunität reduziert wird. Im Bereich der humoralen Immunität wurde unter anderem die Antikörper-Bildung gegenüber Schafserythrozyten nach Primärstimulation getestet und ein dosisabhängiger Einfluß von Asta 5122 gefunden. Diese Beeinträchtigung war nachweisbar, wenn Asta 5122 vor Antigengabe verabreicht wurde und auch nach Antigengabe (4).

Im Bereich der zellulären Immunität konnte gezeigt werden, daß die allergische Spätreaktion nach Listerien-Immunsierung des Meerschweinchens durch Asta 5122 über einen längeren Zeitraum unterdrückt wird (9). Auch die Graft-versus-host-Reaktion wurde in dem Sinne beeinflusst, daß die Absterberate von Empfängern nach Transfusion von allogenetischen Lymphozyten vermindert war (4).

Die weitere Analyse der Wirkungsweise von Asta 5122 ergab, daß das weiße Blutbild in seiner Zusammensetzung deutlich verändert wird: Es kommt zu einer ins Auge fallenden Reduktion der Lymphozytenzahl im peripheren Blut. Hierbei scheinen auch die langlebigen rezirkulierenden Lymphozyten betroffen zu sein. Diese Ergebnisse werden dahingehend interpretiert, daß ein direkter zytotoxischer

Effekt auf die zirkulierenden Zellen besteht (4).

2. Das Listeriose-Modell der Maus

Die experimentelle Listeriose der Maus eignet sich als Modell für die Untersuchung der Immunvorgänge, welche zur Eindämmung bzw. Eliminierung sogenannter fakultativ-intrazellulärer Bakterien führen. Das heißt, solcher Mikroorganismen, welche nach der Phagozytose durch polymorphkernige Granulozyten nicht prompt abgetötet werden, sondern sich im intrazellulären Milieu halten (16). Hierunter fallen Mykobakterien, Brucellen, Candida, Histoplasma, ein- und mehrzellige Parasiten, sowie Viren (2, 29). Infektionen mit diesen Keimen zeichnen sich durch Chronizität, Granulombildung und die Ausbildung einer Allergie vom verzögerten Typ aus.

Die Abwehr gegen intrazellulär-vitale Bakterien beruht auf einem bizellulären Mechanismus (19, 25). Spezifisch reagible T-Lymphozyten werden auf den Antigen-Reiz der Infektion hin gebildet. Diese induzieren eine Granulombildung durch mononukleäre Phagozyten am Infektionsort und eine unspezifische Aktivierung der Makrophagen (1, 17, 27, 10, 31). Beide Modalitäten bringen die Abwehrleistung durch Keimeindämmung bzw. gesteigerte Abtötung der Bakterien zuwege.

3. Ziel der Arbeit

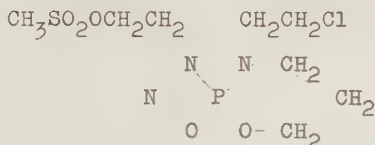
Das Listeriose-Modell bietet die Möglichkeit, eine pharmakologische Beeinflussung durch ein Immunsuppressivum auf die antibakterielle Abwehrleistung bei intrazellulären bakteriellen Infektionen zu untersuchen. Im folgenden wird der Einfluß des Immunsuppressivums Asta 5122 an diesem Infektionsmodell geprüft. Es wird gezeigt, daß Asta 5122 auf die Entwicklung der aktiven Anti-Listerien-Immunität hemmend einwirkt. Anhand des passiven Übertragungsversuches wird gezeigt, daß die Schwächung der

Abwehrleistung sowohl durch einen direkten zytotoxischen Effekt auf die lymphozytäre Komponente wie auch durch eine funktionelle Schädigung der mononukleär-phagozytären Komponente zustandekommt.

C) Materialien und Methoden

1. Materialien

- 1.1. Testsubstanz: Asta 5122 der Asta-Werke AG, Brackwede, als Reinsubstanz = 3-(2-Chloräthyl)-2-(2-mesyloxyäthylamino)-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid;
Strukturformel:



Die Substanz wurde von Herrn Prof. Dr. E. Lemmel zur Verfügung gestellt. Die LD₅₀ für Asta 5122 liegt nach Literaturangaben (4) in NMRI-Mäusen bei ca. 350 mg/kg.

Für unsere Versuche wurde eine Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht bei einmaliger Dosierung verabreicht. Die Substanz wurde unmittelbar vor der Injektion in 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgelöst und 0,2 ml einer entsprechenden Verdünnung dem Versuchstier intraperitoneal appliziert.

- 1.2. Medium : Hanks' Minimal Essential Medium (MEM, Flow Laboratories), mit sterilem Natriumbicarbonat, 3,5 %ig, auf p_H von 7,3 eingestellt;
Zusätze: 5 % fetales Kälberserum,
100 IU/ml Penicillin und
Streptomycin und
5 IU/ml Heparin (Thrombophob^R)

1.3. Nährböden : Tryptose-Soya-Agar, bzw. -Bouillon
(Oxoid)

1.4. Bakterien : *Listeria monocytogenes*, Stamm EGD,
Serotyp I, wurde durch kontinuierliche
Mäusepassage mäusepathogen gehalten;
 LD_{50} für intravenös injizierte Listerien
(für die benutzten Mäuse): 5×10^3 -
 1×10^4

1.5. Tiere

1.5.1. : Für die Untersuchungen über aktive und
passive Immunität: Mäuse des Stammes
CD-1 wurden als spezifisch pathogen-
freie Tiere von Charles River Laboratories,
France, St. Aubin les Elbeuf, erworben
und bei konventioneller Haltung über
mehrere Generationen gezüchtet. Sie er-
hielten Futter (Altromin) und Wasser ad
libitum. In den Untersuchungen kamen
Tiere beiderlei Geschlechts, etwa 5 - 6
Wochen alt, zur Anwendung.

1.5.2. : Zur Prüfung der allergischen Spätreaktion:
Pathogenfreie NMRI-Mäuse, von der Firma
Ivanovas, Kisslegg/Allgäu, erworben,
5 - 6 Wochen alt.

1.6. Geräte

1.6.1. : Homogenisator nach Potter Elvehjem (Braun
Melsungen, Homogenisator Potter S),
1500 Upm.

1.6.2. : Homogenisatorgefäß mit Überlaufkammer,
aus Borsilikatglas, mit eingeschliffenen
Glaskolben (Braun Melsungen).

- 1.6.3. : Zylindrische Gewebehomogenisatorgefäße, Typ Potter Elvehjem, S 31, mit geraden Teflon-Pistillen, S 21 (TRI-R Instruments Inc.)
- 1.6.4. : "Schnelltaster", System Kröplin (H. C. Kröplin GmbH, Schlüchtern).

2. Methoden

2.1. Bestimmung des Infektionsverlaufs

2.1.1. Infektion

Für eine i.v. Infektion wurde die Milz einer infizierten Maus am dritten Infektionstag entnommen und in 0,9 %iger Kochsalz-Lösung homogenisiert. Von der Suspension wurden 0,1 ml in Tryptose-Soya-Bouillon 8 Stunden lang bei 37° C inkubiert und anschließend in einer Petroff-Hauser-Kammer ausgezählt. Die gewünschte Bakterienzahl wurde durch entsprechende Verdünnung in 0,9 %iger NaCl-Lösung eingestellt und in einem Volumen von 0,2 ml in die Schwanzvene der Versuchstiere injiziert.

Zur Kontrolle der Bakterienzahl des Inokulums wurden gleichzeitig 0,1 ml in einer entsprechenden Verdünnung auf Tryptose-Soya-Agar aufgetragen und nach Inkubation die Zahl der gewachsenen Kolonien ausgezählt.

2.1.2. Bestimmung der Keimzahlen in Leber und Milz

Da die intravenös injizierten Bakterien in Leber und Milz aus der Blutbahn herausgefiltert werden, ist der Bakteriengehalt in diesen Organen ein Maß für den Stand der Infektion (16, 24). Gruppen von je fünf Versuchstieren wurden 15 Minuten und anschließend alle 24 Stunden nach Infektionsbeginn durch zervikale Dislokation getötet.

Steril entnommene Lebern und Milzen wurden in gläsernen Homogenisier-Kolben in 10 ml Gesamtvolumen einer 0,9 %igen Kochsalzlösung separat homogenisiert, 0,1 ml des Homogenisates auf Tryptose-Soya-Agar-Platten aufgetragen und nach Inkubation bei 37° C die Kolonien ausgezählt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors ließ sich aus den erhaltenen Zahlen die Gesamtzahl der lebenden Listerien pro Organ errechnen. Der Mittelwert der Zehnerlogarithmen der Keimzahlen in den Organen von je fünf Tieren wurde in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen. Die auf diese Weise ermittelten Werte ergaben eine Verlaufskurve der Infektion in Lebern und Milzen.

2.2. Die passive Übertragung von Anti-Listerien-Immunität

2.2.1. Gewinnung von Milzzellen aus Listeria-immunen Mäusen

Prospektive Spender von Listeria-spezifischen Lymphozyten wurden mit 5×10^3 - 1×10^4 lebenden Listerien immunisiert. Am 6. Infektionstag wurden die überlebenden Tiere getötet, ihre Milzen steril entnommen, in eisgekühltem MEM mit einem Skalpell zerkleinert und vorsichtig durch ein 80iger Stahlsieb gepreßt. Die Zellsuspension wurde durch eine 6 cm hohe sterile Baumwollsäule filtriert, bei 4° C und 300 x g 15 Minuten lang zentrifugiert, zweimal in MEM gewaschen, resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 5×10^8 Zellen pro ml eingestellt.

2.2.2. Messung der passiv übertragenen Immunität

Normalen Empfängertieren wurden $1 - 2 \times 10^8$ Zellen aus Listeria-immunen Spendern intravenös infiziert und anschließend eine Infektion mit 5×10^4 - 1×10^5 lebenden Listerien gesetzt. Die Keimvermehrung in Leber und Milz wurde 48 Stunden lang verfolgt und die Differenz der Bakterienzahlen zwischen Kontrolltieren und passiv im-

munisierten Tieren als Maß für die durch die übertragenen Lymphozyten induzierte Immunitätsleistung gewählt.

2.3. Messung der allergischen Reaktion vom Spättyp

2.3.1. Herstellung des Listeria-Antigens

Eine zehnfach konzentrierte Tryptose-Soya-Bouillon wurde gegen ein zehnfaches Volumen Aqua dest. dialysiert. In der erhaltenen Lösung wurde eine Listerienkultur über 1 - 2 Tage bei 37° C inkubiert und daraus ein Kulturfiltrat gewonnen. Dieses wurde anschließend in einer Desaga-Anlage konzentriert. Zur Prüfung und Standardisierung der Antigen-Konzentration wurden fünf Versuchstiere mit $3 - 5 \times 10^3$ lebenden Listerien wie üblich immunisiert und am sechsten Infektionstag 0,05 ml der hergestellten Antigenlösung subkutan in die Fußballen der Tiere injiziert. Es ergab sich eine Schwellung von etwa 0,5 mm.

2.3.2. Nachweis der verzögerten allergischen Reaktion

Am sechsten Infektionstag wurden 0,05 ml der Antigenlösung fünf immunisierten Tieren subkutan in den linken hinteren Fußballen und zur Kontrolle in den rechten hinteren Fußballen dasselbe Volumen einer 0,9 %igen Kochsalzlösung injiziert. 24 Stunden später wurde die Fußballendicke auf beiden Seiten mit Hilfe eines Schnell-tasters bestimmt, und der Mittelwert der Differenzen zwischen der Dicke des rechten und linken Fußballens ermittelt.

D) Ergebnisse

I. Aufbau des Testsystems

1. Verlauf einer Erstinfektion mit *Listeria monocytogenes* in der normalen Maus

Normale CD-1 Mäuse wurden mit lebenden *Listerien* infiziert und die Bakterienzahlen in Leber und Milz bestimmt, wie in Materialien und Methoden angegeben. In Abb. 1 ist eine Vermehrungskurve wiedergegeben.

Lebende Listerien

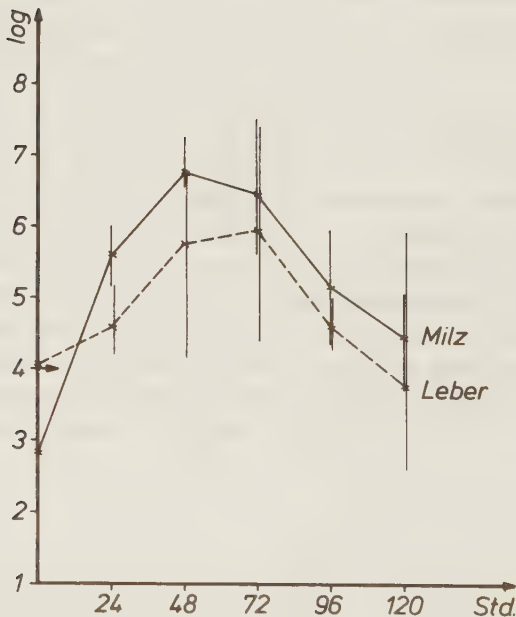


Abb. 1: Vermehrung von *Listeria monocytogenes* in Leber und Milz intravenös infizierter Tiere. Jeder Punkt ist der Durchschnittswert von je fünf Tieren (mit Gesamtstreuung).----> = Injizierte Bakterienzahlen

Die Keimzahlen steigen während der ersten drei Tage nahezu logarithmisch an. Am dritten Tag erreichen die Bakterienzahlen ihr Maximum, und der Aufwärtstrend wird unterbrochen. Daraufhin nehmen die Bakterienzahlen ab, und in der Regel sind Leber und Milz 10 - 14 Tage nach Infektionsbeginn wieder keimfrei. Die Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Erreger haben sich offensichtlich am dritten Infektionstag grundlegend geändert: Der Organismus erwirbt die Fähigkeit, die Netto-Keimvermehrung zu bremsen und schließlich die Bakterien zu eliminieren.

2. Die passive Übertragung von Anti-Listerien-Immunität durch lymphoide Milzzellen aus Listeria-immunen Spendern

Die Ausbildung der aktiven Anti-Listerien-Immunität, wie sie um den dritten Tag einer Erstinfektion mit *Listeria monocytogenes* erfolgt, wird von der Bildung von T-Lymphozyten mit *Listeria*-Spezifität begleitet (28, 21, 33). Die spezifischen Lymphozyten (und nicht Antikörper) stellen die entscheidenden Reaktionsprodukte des Immunsystems nach der Sensibilisierung mit *Listerien* dar (27). Es ist daher möglich, die Fähigkeit zur Ausbildung einer Anti-Listerien-Immunität durch lymphoide Zellen aus *Listeria*-immunen Spendertieren auf normale Empfänger zu übertragen. Durch den Besitz der durch die Übertragung passiv erworbenen spezifisch reagiblen T-Lymphozyten werden die Tiere in die Lage versetzt, nach Kontakt mit dem homologen Antigen die antibakterielle Abwehrleistung beschleunigt und mit größerer Wirksamkeit aufzubauen als Normaltiere (30, 27).

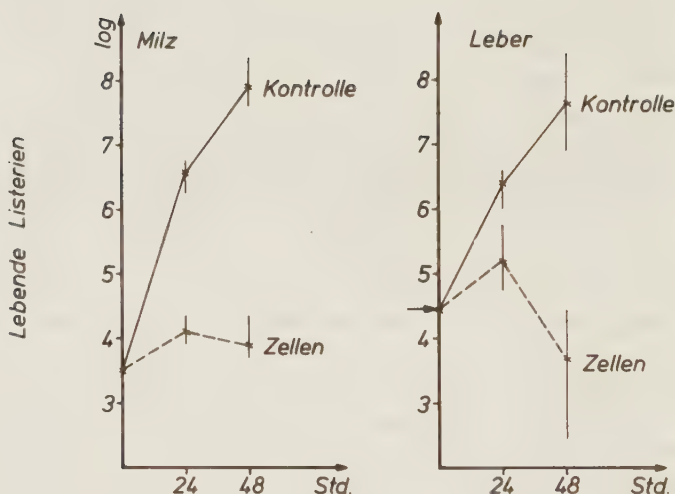


Abb. 2: Wachstum von *Listeria monocytogenes* in Mäusen, welche mit $1,6 \times 10^8$ Milzzellen aus *Listeria*-immunem Spendern passiv immunisiert wurden. Durchschnittswerte von je fünf Tieren.

In Abb. 2 ist der Verlauf einer *Listerien*infektion bei passiv immunisierten Mäusen wiedergegeben. In diesem Experiment hatten normale Empfängermäuse $1,6 \times 10^8$ vitale Lymphozyten aus Spendertieren mit einer sechs Tage alten *Listerien*infektion erhalten. Sie wurden am Tage der passiven Zellular-Immunisierung mit 3×10^4 lebenden *Listerien* infiziert und der Verlauf der Infektion während der anschließenden 48 Stunden verfolgt. Offensichtlich wurden die Mäuse durch die passive Immunisierung befähigt, einen antibakteriellen Schutz aufzubauen, welcher 48 Stunden nach Infektionsbeginn vier Zehnerpotenzen der Keimzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe betrug.

II. Versuche zur Wirkung von Asta 5122

1. Einfluß von Asta 5122 auf die Entwicklung der aktiven Anti-Listerien-Immunität

1.1. Bei simultaner Gabe mit der Infektion

Einer Gruppe von 30 Mäusen wurde am Tag der Infektion 50 mg/kg Asta 5122 intraperitoneal injiziert. Die behandelte Gruppe und eine unbehandelte Kontrollgruppe erhielten am gleichen Tag 4×10^3 lebende Listerien intravenös. Der Infektionsverlauf in beiden Gruppen wurde während der daran anschließenden fünf Tage verfolgt.

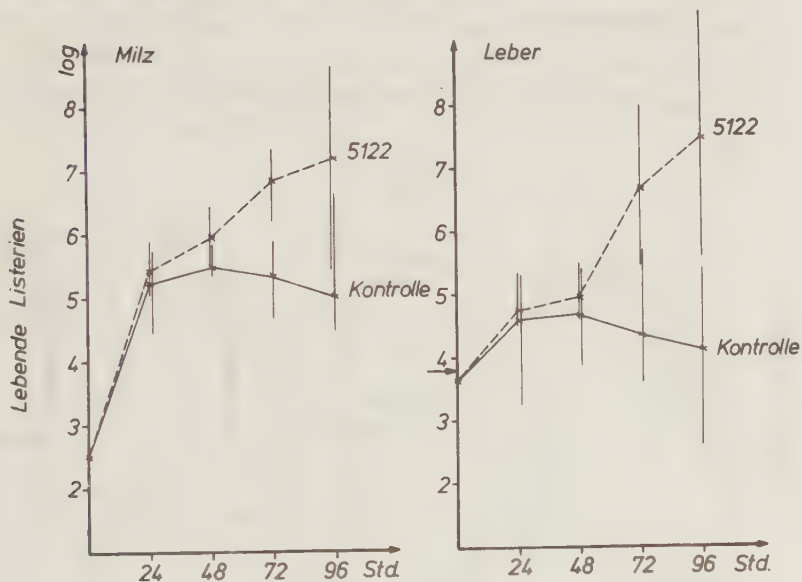


Abb. 3: Vermehrung von Listerien in Mäusen, die gleichzeitig mit der Infektion Asta 5122 erhalten haben. Durchschnittswerte von je fünf Tieren.

---> = Injizierte Keimzahlen

In Abb. 3 ist das Ergebnis dieses Experiments zusammengefaßt: Während der Infektionsverlauf bei den Kontrolltieren dem Normalverhalten entspricht, ist bei den Asta 5122-behandelten Tieren die Fähigkeit zum Aufbau einer aktiven Anti-Listerien-Immunität reduziert worden. Die Keimzahlen steigen bei den immunsuppressiv behandelten Tieren ohne Unterbrechung bis zum Ende des Experiments an.

1.2. Bei Gabe während der ersten zwei Tage der Infektion

Drei Gruppen von je 30 Mäusen wurden mit 1×10^4 lebenden Listerien pro Maus infiziert. 24 bzw. 48 Stunden später wurden die Mäuse zweier Gruppen mit Asta 5122 behandelt; die dritte Gruppe diente als Kontrolle und erhielt 0,9 %ige Kochsalzlösung.

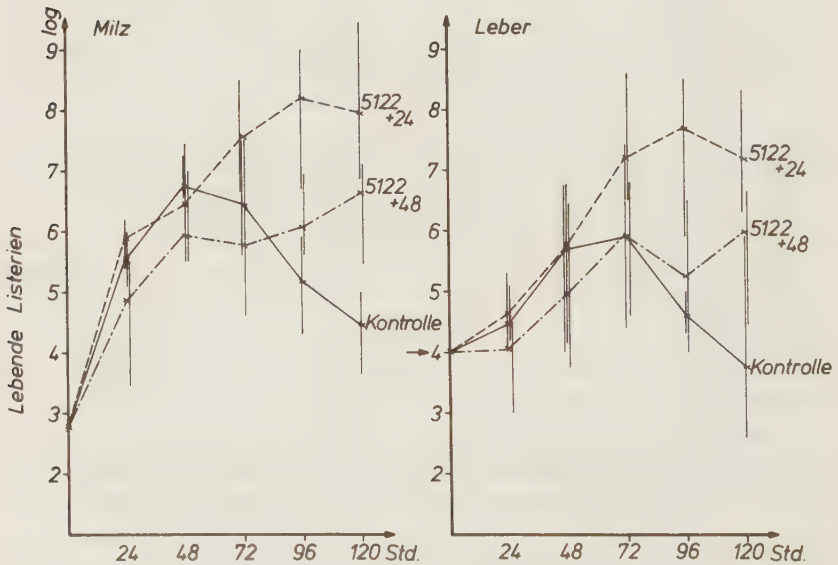


Abb. 4: Listerien-Vermehrung in Mäusen, die Asta 5122 24 Stunden (5122₊₂₄) bzw. 48 Stunden (5122₊₄₈) nach Infektionsbeginn erhalten haben. Durchschnittswerte von je fünf Tieren.

Aus den Daten der Abb. 4 geht hervor, daß die Injektion von Asta 5122 auch dann zu einer Aufhebung der Abwehrleistung führt, wenn es 24 oder 48 Stunden nach Infektionsbeginn gegeben wird.

1.3. Bei Gabe zu verschiedenen Zeiten vor der Infektion

Auch die Applikation von Asta 5122 vor Infektionsbeginn führt zu einem Abfall der Immunitätsleistung, wie sich in folgenden Experimenten zeigen läßt:

1.3.1. Bei Gabe 24 bzw. 48 Stunden vor Infektionsbeginn

In diesem Experiment wurde Asta 5122 24 bzw. 48 Stunden vor der Infektion mit 7×10^3 lebenden *Listerien* injiziert. Anschließend wurde der Infektionsverlauf wie üblich gemessen und mit den Kontrollen verglichen. Das Ergebnis ist in Abb. 5 wiedergegeben.

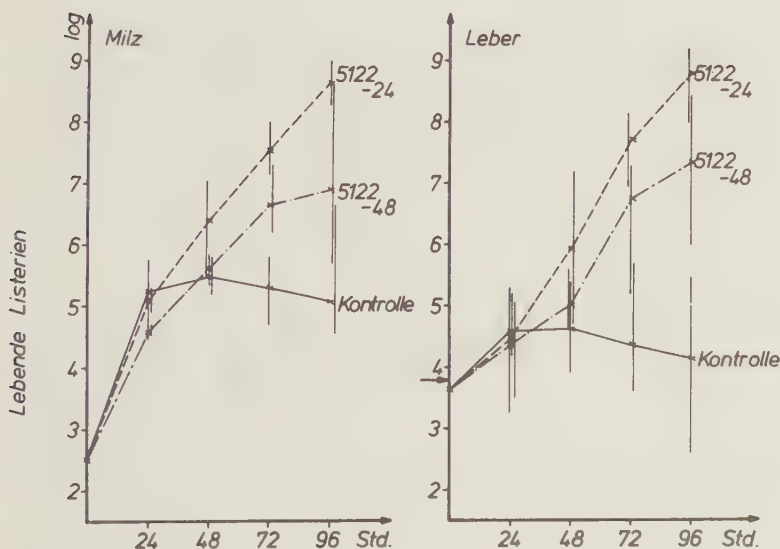


Abb. 5: Listerienvermehrung in Mäusen, die Asta 5122 24 Stunden (5122₋₂₄) bzw. 48 Stunden (5122₋₄₈) vor Infektionsbeginn erhalten haben. Durchschnittswerte von je fünf Tieren.

Aus dem Experiment geht hervor, daß bei Gabe von Asta 5122 24 oder 48 Stunden vor Infektionsbeginn die Fähigkeit der Tiere zum Aufbau einer Immunität so vermindert ist, daß die antibakterielle Abwehrleistung nicht zustandekommt. Die Wirkung von Asta 5122 ist demnach nicht an eine vorhergehende oder gleichzeitige Antigen-Stimulation gebunden, sondern sie manifestiert sich auch dann, wenn noch kein Antigen-Kontakt vorgelegen hat.

1.3.2. Bei Gabe sieben Tage vor Infektionsbeginn

Verlängerte man die Frist zwischen Infektion und Applikation von Asta 5122 auf sieben Tage, so ließ sich kein immunsuppressiver Effekt mehr beobachten.

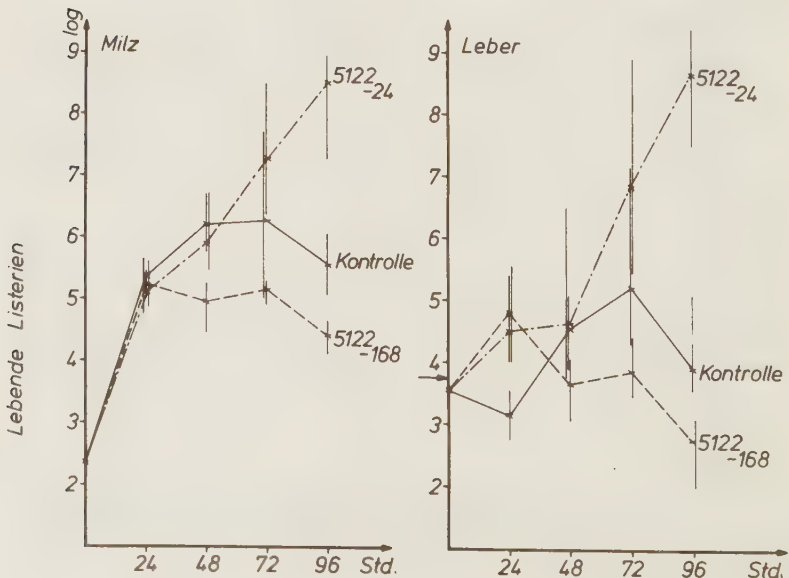


Abb. 6: Listerienvermehrung in Mäusen, die Asta 5122 168 Stunden (5122₋₁₆₈) vor Infektionsbeginn erhalten haben. Durchschnittswerte von je fünf Tieren.

Die Abb. 6 zeigt, daß es bei diesem Injektionsschema eher zu einer Verstärkung der antiinfektiösen Abwehrleistung im Sinne eines Rebound-Phänomens kommt. Dieser Hinweis wurde jedoch nicht in weiterführenden Experimenten überprüft.

1.4. Zusammenfassende Darstellung an Hand eines Immunsuppressions-Index

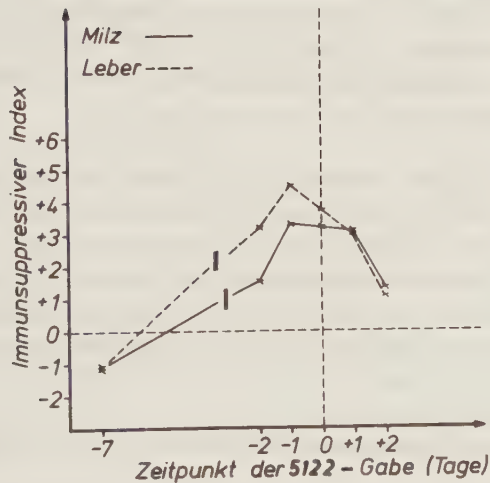


Abb. 7: Immunsuppressions-Indices in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe von Asta 5122 (siehe Text).

In Abb. 7 ist eine Zusammenfassung der erhobenen Befunde über die Wirkung von Asta 5122 in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen der Gabe des Immunsuppressivums und der Infektion wiedergegeben. Hierbei wurde ein Immunsuppressions-Index verwendet (45). Der Index errechnet sich aus der Differenz der Bakterienzahlen in Kontrollen und in Asta 5122-behandelten Tieren zum Zeitpunkt der 96. Stunde nach Infektionsbeginn. Dieser Zeitpunkt wurde deshalb gewählt, weil die Unterschiede der Keimzahlen in den verglichenen Gruppen 96 Stunden nach Infektionsbeginn am größten waren.

2. Einfluß von Asta 5122 auf die passiv übertragene Anti-Listerien-Immunität

Die bisherigen Versuchsergebnisse erlauben keinen Aufschluß darüber, welche Komponente der antibakteriellen Abwehr durch das Immunsuppressivum geschädigt wurde: Angriffspunkt für Asta 5122 könnten sowohl lymphoide Zellen, mononukleäre Phagozyten, als auch beide Zellkomponenten des Abwehrmechanismus sein.

Für die nähere Prüfung dieser Frage erwies sich das passive Übertragungsexperiment als nützlicher Experimentalzugang. Mit Hilfe dieses Experimentes ist es möglich, die kollaborierenden zellulären Partner getrennt zu betrachten und dadurch zu zeigen, welche Zellular-Komponente den Angriffspunkt für die immunsuppressive Substanz darstellt.

2.1. Einfluß von Asta 5122 auf die lymphozytäre Komponente

Prospektive Spender von Milzlymphozyten wurden mit 1×10^4 lebenden Listerien immunisiert. Fünf Tage später erhielten die immunisierten Zellspender eine Injektion von Asta 5122. Nach weiteren 24 Stunden wurden den vorbehandelten Tieren sowie immunisierten, nicht vorbehandelten Kontrollen die Milzzellen entnommen und nach Über-

tragung auf nicht-immune Empfänger auf ihre biologische Aktivität untersucht. Insgesamt wurden $2,5 \times 10^8$ vitale Milzlymphozyten pro Maus übertragen, und anschließend wurde mit 3×10^4 lebenden Listerien infiziert.

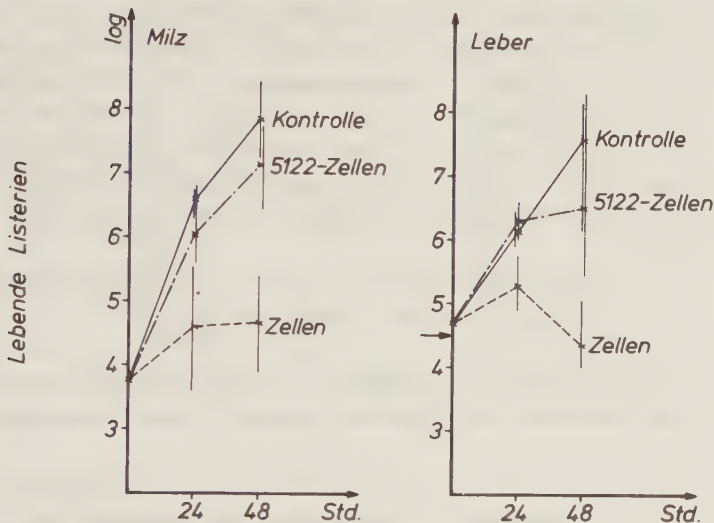


Abb. 8: Einfluß von Asta 5122 auf die lymphoide Komponente der Anti-Listerien-Immunität: Behandlung der Spender von spezifisch reagiblen Milzlymphozyten mit Asta 5122. Durchschnittswerte von je fünf Tieren (mit Gesamtstrebweite)

Wie in Abb. 8 gezeigt, ist nach Vorbehandlung der immunisierten Zellspender die passive Übertragung von Anti-Listerien-Immunität mit Hilfe von spezifisch reagiblen Milzzellen nicht mehr möglich. Die Vorbehandlung mit Asta 5122 hat demnach die biologische Aktivität der Milzzellen zerstört.

Im folgenden Experiment wurde der Einfluß von Asta 5122 auf die phagozytäre Komponente der zellulären antibakteriellen Immunität geprüft. Dies geschah dadurch, daß man die Empfänger spezifisch reagibler Milzlymphozyten vor der Zellular-Immunisierung und Infektion einer Behandlung mit Asta 5122 aussetzte. Bei einem ausreichend langem Zeitraum zwischen Vorbehandlung und Immuntransfer (Ausschaltung einer direkten Einwirkung von noch nicht eliminiertem Asta 5122 auf die übertragenen Lymphozyten) müßte sich dann feststellen lassen, ob die Behandlung der Zellempfänger mit Asta 5122 einen Ausfall der Fähigkeit zum Aufbau der Abwehrleistung erzeugt. Sollte dies der Fall sein, würde das bedeuten, daß die zweite, vom Empfänger beigetragene Komponente geschädigt worden ist.

2.2. Einfluß von Asta 5122 auf die phagozytäre Komponente der Anti-Listerien-Immunität

Als Zeitintervalle zwischen Vorbehandlung mit Asta 5122 und Zellular-Immunisierung wurden 0,24 und +8 Stunden gewählt.

2.2.1. Behandlung der Empfänger zum Zeitpunkt der passiven Zellular-Immunisierung und Infektion

Prospektive Empfänger von spezifisch reagiblen Lymphozyten wurden mit Asta 5122 vorbehandelt und erhielten unmittelbar darauf ein Inokulum von 2×10^8 vitalen Milzlymphozyten sowie gleichzeitig eine Infektion mit 5×10^4 lebenden Listerien. Abb. 9 zeigt den Verlauf der Infektion während der folgenden 48 Stunden.

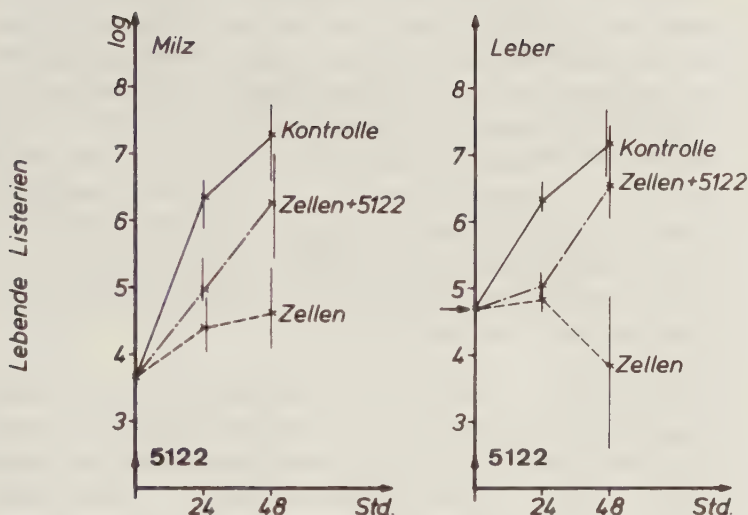


Abb. 9: Einfluß von Asta 5122 auf die mononukleär-phagozytäre Komponente der Anti-Listerien-Immunität: Behandlung der Empfänger von spezifisch reagiblen Lymphozyten mit Asta 5122. Durchschnittswerte von je fünf Tieren.

Abb. 9 zeigt, daß durch die Behandlung der Zellempfänger mit Asta 5122 die biologische Wirkung der Milzlymphozyten ebenfalls nicht zum Zuge kommt.

Wegen des zu kurzen Zeitintervalls zwischen Vorbehandlung und Immuntransfer erlaubt dieses Experiment noch keine Rückschlüsse darauf, ob die zweite, monozytär-phagozytäre Komponente im Empfänger durch die Behandlung mit Asta 5122 geschädigt wurde, oder aber ob die übertragenen Milzlymphozyten durch in der Zirkulation befind-

liches Asta 5122 an der Ausübung ihrer Funktion gehindert wurden. Es war daher notwendig, das Experiment zu wiederholen, und zwar mit einem Intervall zwischen Asta 5122-Gabe und Zellular-Immunisierung, das gewährleistete, daß die Substanz aus der Zirkulation verschwunden war (6, 7). Aus pharmakologischen Studien ist bekannt, daß 24 bzw. 48 Stunden nach Applikation von Asta 5122 nicht mehr mit wirksamen Mengen in der Zirkulation zu rechnen ist. Auf der anderen Seite ist zu erwarten, daß sich eine durch zytotoxische Effekte an der Monozyten-Produktion und am peripheren Monozytenpool ansetzende Wirkung eines Immunsuppressivums nach 24 bzw. nach 48 Stunden sehr wohl bemerkbar machen würde.

Es ist bekannt, daß zu diesen Zeitpunkten eine Monozytopenie auftritt, welche vor allem auf Grund der peripheren Zytotoxizität einer Substanz entsteht, wenn der Nachschub von Monozyten aus dem Knochenmark nicht schnell genug zur Kompensierung der Verluste führt (4). Es stünden dann weniger periphere Monozyten zur Verfügung, und die Tiere wären nicht in der Lage, auch nach passiver Immunisierung die Infektion unter Kontrolle zu halten.

2.2.2. Behandlung der Empfänger 24 bzw. 48 Stunden vor passiver Zellular-Immunisierung und Infektion

Zwei Gruppen von Mäusen erhielten 24 bzw. 48 Stunden vor der passiven Zellular-Immunisierung und Infektion Asta 5122 intraperitoneal. 24 bzw. 48 Stunden später erhielt je eine Gruppe sowie eine nicht-vorbehandelte Kontrollgruppe $1,6 \times 10^8$ Lymphozyten aus Milzen von Mäusen mit einer sechs Tage alten Listerieninfektion. Anschließend wurden alle Gruppen mit dem gleichen Inokulum von 5×10^4 lebenden Listerien infiziert und der Krankheitsverlauf während der folgenden 48 Stunden verfolgt.

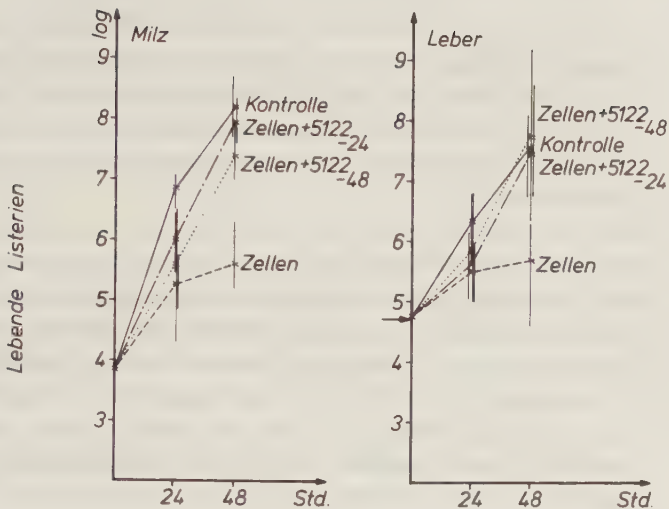


Abb. 10: Einfluß von Asta 5122 auf die mononukleär-phagozytäre Komponente der Anti-Listerien-Immunität: Behandlung der Empfänger von spezifisch reagiblen Lymphozyten mit Asta 5122 24 bzw. 48 Stunden vor passiver Zellular-Immunisierung und Infektion. Durchschnittswerte von je fünf Tieren.

Wie die in Abb. 10 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, waren die Zellempfänger nicht mehr in der Lage, von der passiv übertragenen Immunität zu profitieren, wenn sie Asta 5122 24 bzw. 48 Stunden vor der Zellular-Immunisierung erhalten hatten. Daraus ergibt sich, daß Asta 5122 eine für die Entwicklung der antibakteriellen Abwehrleistung notwendige Komponente im Empfänger geschädigt hat. Auf Grund von Literatur-Daten (17, 18) kommt hierfür die zweite, monozytär-phagozytäre Komponente in Frage.

3. Einfluß von Asta 5122 auf die passiv erworbene Allergie vom verzögerten Typ

Die allergische Reaktion vom verzögerten Typ ist in gleicher Weise wie die zelluläre antibakterielle Immunität von einer Kollaboration zwischen spezifisch reagiblen T-Lymphozyten und monozytären Phagozyten abhängig (26, 27). Für beide Reaktionen gelten die gleichen Mechanismen:

Die allergische Reaktion vom Spättyp tritt bei der Maus gleichzeitig mit der Bildung von spezifisch reagiblen Lymphozyten auf (24). Das Maximum der allergischen Reaktion bei einer Listerieninfektion wird am sechsten Infektionstag erreicht. Die Bereitschaft zur Auslösung einer allergischen Reaktion vom Spättyp kann, wie wiederholt gezeigt wurde, durch Antigen-spezifische T-Lymphozyten passiv übertragen werden (26, 27).

3.1. Prüfung der Wirksamkeit des verwendeten Antigens

Zunächst wurde ein Antigen aus Listerien-Kulturfiltrat hergestellt (s. Materialien und Methoden). Die Wirksamkeit dieses Antigens wurde in Vorversuchen getestet und Unterschiede in der Dickenzunahme nach 0,05 ml Antigen gefunden, wie in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tab. 1:

	Vorbehandlung	
	normal	immunisiert ¹
Antigen	24,2 ²	30,2
NaCl	24,2	23,0
Differenz	0,0	7,2

Tab. 1: Veränderung der Fußballendicke bei normalen und immunisierten Tieren 24 Stunden nach Antigen-Injektion; im Vergleich dazu nach NaCl-Injektion.

- ¹ = aktiv immunisiert mit 3×10^4 lebenden Listerien
- ² = Durchschnittswert von je fünf Tieren, in Einheiten $\hat{=}$ 0,1 mm.

Nachdem damit gezeigt war, daß diese Antigen-Präparation ausreichend stark ist, um eine gut meßbare allergische Spätreaktion zu erzeugen, wurde die Wirkung von Asta 5122 auf die Fähigkeit der Empfänger von Listeria-spezifischen Milzlymphozyten, eine allergische Reaktion vom Spättyp zu entwickeln, geprüft.

3.2. Verminderung der passiv übertragenen allergischen Spätreaktion durch Asta 5122

Prospektive Empfänger von spezifisch reagiblen T-Lymphozyten erhielten 48 Stunden vor dem Zelltransfer und der Testinjektion von Antigen Asta 5122. 48 Stunden später wurde bei dieser Gruppe und einer nicht behandelten Kontrollgruppe eine passive Zellular-Allergisierung mit $1,7 \times 10^8$ Milzlymphozyten aus Listeria-immunen Spendern durchgeführt. Anschließend erhielten beide Gruppen eine Testinjektion von 0,05 ml Antigen in den rechten hinteren Fußballen und zur Kontrolle eine Injektion von 0,05 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung in den Fußballen der Gegenseite.

Die Dickenzunahme wurde 24 Stunden später gemessen und mit der Dickenzunahme der kontralateralen Fußballen verglichen. Die Gruppe der Milzzellspender wurde am sechsten Tag nach der aktiven Immunisierung ebenfalls auf das Vorliegen einer allergischen Spätreaktion gegen Listeria-Antigen hin untersucht und reagierte positiv. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abb. 11 zusammengefaßt.

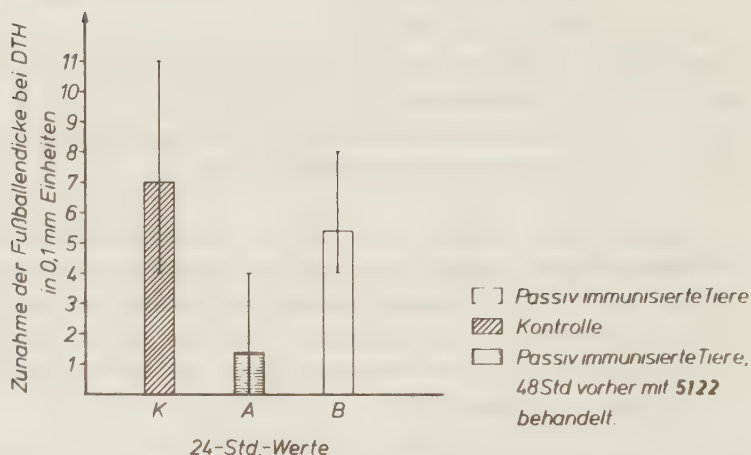


Abb. 11: Allergische Spätreaktion (Hauttest) in passiv immunisierten Mäusen, die 48 Stunden vor der Testinjektion Asta 5122 erhalten haben. Durchschnittswerte von je fünf Tieren.

Es zeigte sich deutlich, daß die passive Übertragung von Milzlymphozyten aus *Listeria*-immunen Spendern die Empfänger in die Lage versetzt hat, auf die Antigen-Injektion eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ zu entwickeln. Auf der anderen Seite waren passiv allergische und Asta 5122-behandelte Empfänger von spezifisch reagiblen Lymphozyten dazu nicht mehr in der Lage. Es hat also die Behandlung mit Asta 5122 in analoger Weise wie bei der Anti-*Listerien*-Immunität eine Schädigung der zweiten Komponente, die für das Zustandekommen der allergischen Spätreaktion verantwortlich ist, herbeigeführt.

E) Diskussion

Die Listeriose der Maus ist ein bewährtes Modell für Untersuchungen über die Abwehrleistung gegenüber intrazellulär vitalen Bakterien. Die gesteigerte Abtötungsfähigkeit der mononukleären Phagozyten für Bakterien und die Granulombildung werden durch die Reaktion zwischen spezifischen T-Lymphozyten und Antigen induziert. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch am Werke, um bei gewissen Viren, Parasiten und Pilzen die Schutzfunktionen zu erbringen, welche zur Keimeindämmung und -eliminierung führen. Wie greift ein Immunsuppressivum in den Ablauf dieser Vorgänge ein?

Die klinische Erfahrung hat gezeigt, daß sich unter immunsuppressiver Therapie häufig Infektionen entwickeln. Durch konsequente antibiotische Abdeckung läßt sich im Falle von Infektionen mit Eitererregern im allgemeinen eine ausreichende Prophylaxe betreiben. Eine größere Gefahr als pyogene Keime stellen jedoch Infektionen durch Viren, Pilze und fakultativ intrazelluläre Bakterien dar, weil diese sich nicht leicht durch Medikamente kontrollieren lassen. Diese Tatsache zwingt den Organismus, auf seine eigenen Abwehrfunktionen zurückzugreifen. Die Entwicklung von neuen Immunsuppressiva muß die Bedeutung der reibungslos funktionierenden Abwehrmechanismen berücksichtigen. Es sollte daher geprüft werden, welche Auswirkungen neuentwickelte Immunsuppressiva auf die zellulären Abwehrleistungen gegenüber intrazellulären infektiösen Agentien besitzen.

Die experimentelle Listerien-Infektion der Maus wurde als Testsystem für die Messung einer Schädigung der zellulären antibakteriellen Abwehrleistung durch Behandlung mit einem neuen Immunsuppressivum, Asta 5122, angewandt. Es handelt sich um ein Oxazaphosphorin-Derivat, welches indirekt vom Cyclophosphamid abstammt.

Asta 5122 verhinderte die Entwicklung einer aktiven Immunität gegen Listerien: Behandlung der Versuchstiere zum Zeitpunkt

der Infektion und ein bis zwei Tage nachher führten zu einem Versagen der Abwehr (Abb. 3 und 4). Eine Behandlung 24 oder 48 Stunden vor Infektionsbeginn führte zu dem gleichen Ergebnis (Abb. 5).

Auf der anderen Seite erwies sich Asta 5122 als unwirksam, wenn es sieben Tage vor Infektionsbeginn gegeben wurde; im Gegenteil, es kam sogar zu einer leichten Verstärkung der Abwehrleistung (Abb. 6).

Auch die bereits etablierte Immunität (nach Übertragung von spezifisch immunisierenden T-Lymphozyten) wurde durch Asta 5122 beeinflußt: Behandlung der immunen Spender von Listeria-spezifischen Lymphozyten mit Asta 5122 24 Stunden vor der Zellentnahme führte zu einem Verlust der biologischen Aktivität der Lymphozyten im Übertragungsversuch. Auch die Behandlung der Zellempfänger mit Asta 5122 hatte eine Minderung der passiv übertragenen Immunität zur Folge, und zwar zu einem Zeitpunkt, zu dem eine Wirkung des vorinjizierten Asta 5122 ausgeschlossen werden konnte (Abb. 10).

Als drittes ließ sich zeigen, daß Asta 5122 die Ausbildung einer allergischen Spätreaktion unterdrückt: Eine Behandlung nicht-sensibilisierter Mäuse mit Asta 5122 48 Stunden vor einer passiven Zellular-Allergisierung und Antigen-Injektion verminderte die allergische Reaktion vom verzögerten Typ (Abb. 11).

Bisher durchgeführte Untersuchungen an immunologischen Modellen mit Asta 5122 haben ergeben, daß diese Substanz eine Unterdrückung sowohl der Antikörperbildung als auch der zellulären Immunität bewirkt. Dies wurde von Brock und Potel (9) mit Hilfe von Antikörper-Titerbestimmungen an Ratten und Mäusen und der verzögerten allergischen Hautreaktion nach Listeria-Immunisierung am Meerschweinchen gezeigt.

Die Ergebnisse dieser Autoren erfuhren durch Befunde von

Botzenhardt und Lemmel eine Bestätigung (4). Diese Autoren berichten ebenfalls eine Reduktion des Antikörper-Titers gegenüber Schafserythrozyten, sowie eine Hemmung der zellulären Immunitätsleistungen, in diesem Fall gemessen an der Graft-versus-host-Reaktion. Die Prüfung des weißen Blutbildes nach Verabreichung von Asta 5122 ergab, daß es zunächst zu einer Reduktion der Zahl aller Zellen des peripheren Blutbildes und anschließend zu einer Regeneration der relativ kurzlebigen Granulozyten und monozytären Zellen kommt. Die Zahl der langlebigen mittleren und kleinen Lymphozyten bleibt dagegen über längere Zeit erniedrigt (4).

Daraus läßt sich schließen, daß Asta 5122 eine peripher-zytotoxische Wirksamkeit besitzt. Diese Eigenschaft führt zu einer Verarmung an langlebigen Zellen im Blut; und da sie bei Asta 5122 besonders ausgeprägt ist, dürfte sie den wesentlichen Unterschied zwischen Asta 5122 und den antiproliferativ wirkenden Substanzen darstellen (23). Auch Brock und Potel haben diese Wirkung von Asta 5122 betont und sehen sie als vorwiegend lymphotoxisch und nicht als myelotoxisch an (9). Im Vordergrund steht bei der Wirkung von Asta 5122 die Schädigung der immunkompetenten Zellen in der Peripherie, und die Wirkung auf die schnell proliferierenden Zellen fällt im Vergleich hierzu weniger ins Gewicht. Aus diesem Befund läßt sich eine gewisse Selektivität in der immunsuppressiven Wirkungsweise von Asta 5122 ableiten.

Die eigenen Ergebnisse fügen sich zwanglos in die bekannten Befunde ein. Der Abwehrapparat wurde durch eine einmalige Gabe von Asta 5122 zum Zeitpunkt des Einsetzens der experimentellen Infektion ausgeschaltet. Durch zeitliche Variation des Infektionsschemas ließ sich zeigen, daß Asta 5122 auch schon vor Sensibilisierung die Zellen der Abwehr schädigt. Ebenso ließ sich nachweisen, daß eine schon angestoßene Abwehrreaktion in ihrem Ablauf durch Asta 5122 unterbrochen werden kann. Ein vorausgegangener Antigen-Kontakt ist demnach nicht für die Wirkung von Asta 5122 erforderlich.

Die passive Zellular-Immunisierung erlaubte die Auftrennung des bizellulären Abwehrmechanismus in seine Einzelkomponenten. Durch die Behandlung von Spendern bzw. Empfängern von spezifisch reagiblen Milzlymphozyten mit Asta 5122 in separaten Experimenten ließ sich klären, auf welcher Ebene Asta 5122 in den Ablauf der Abwehrreaktion eingreift.

Die Injektion von Asta 5122 in prospektive Spender mit einer fünf Tage alten immunisierenden Listerieninfektion führte zur Aufhebung der biologischen Aktivität der immunitätsübertragenden Zellen: Die spezifisch reagiblen Milzlymphozyten aus den Asta 5122-behandelten Spendern waren nicht mehr in der Lage, bei den mononukleären Phagozyten in unbehandelten Empfängern die zur Keimeliminierung nötige gesteigerte biologische Aktivität zu induzieren. Damit war ein schädigender Einfluß von Asta 5122 auf die in den spezifisch reagiblen T-Lymphozyten etablierte Immunantwort nachgewiesen.

Darüberhinaus gab der Ausfall der Vorbehandlung der Zellempfänger mit Asta 5122 Aufschluß darüber, ob auch die Zellkomponente der mononukleären Phagozyten beeinflußt wird. Die Asta 5122-Behandlung führte zu deren Unvermögen, nach passiver Zellular-Immunisierung die Abwehrleistung zu erbringen. Somit muß auch das ausführende System der mononukleären Phagozyten geschädigt worden sein. Die Asta 5122-Injektion erfolgte 24 bzw. 48 Stunden vor der Zellübertragung, so daß Asta 5122 keinen Einfluß auf die übertragenen Lymphozyten mehr ausüben konnte.

Der gleiche Schluß ergab sich aus der passiven Zellular-Allergisierung und anschließenden Messung der allergischen Spätreaktion in den Zellempfängern: Eine Asta 5122-Behandlung 48 Stunden vor Antigen-Injektion und Zellular-Allergisierung mit Listeria-spezifischen Milzlymphozyten führte zu einer Reduktion der allergischen Reaktion vom verzögerten Typ. Auch in diesem Experiment ließ sich die Schädigung der mononukleären Phagozyten durch Asta 5122 bestätigen.

Zusammenfassend läßt sich aus den geschilderten Befunden ableiten, daß sich die peripher-zytotoxische Wirkung von Asta 5122 sowohl auf das spezifische Immunprodukt, die spezifisch reagiblen T-Lymphozyten, als auch auf die Träger der unspezifischen Abwehrleistung, die mononukleären Phagozyten, erstreckt.

Ein Hinweis auf eine mögliche Regeneration der kurzlebigen phagozytären Blutzellen nach Asta 5122 ergibt sich aus dem Ergebnis einer sieben Tage vor Infektionsbeginn vorgenommenen Behandlung. Der beobachtete immunitätsverstärkende Effekt könnte Ausdruck einer überschießenden Neubildung der monozytären Freßzellen sein (siehe Abb. 6). Lemmel (23) hat für polymorphkernige Granulozyten und Monozyten zwischen dem fünften und zehnten Tag nach Asta 5122-Behandlung eine Erhöhung der Zellzahlen auf 200 % bis 250 % des Ausgangswertes gefunden. Allerdings wurden zu dieser Frage keine weiterführenden Experimente unternommen.

Eine Vergleichsmöglichkeit zwischen der Wirkung von Asta 5122 und seiner Muttersubstanz Cyclophosphamid am Listeriose-Modell bieten die Arbeiten von Tripathy und Mackaness (44, 45). Diese Autoren erzielten bei der Prüfung des Cyclophosphamid-Einflusses auf die aktive Anti-Listerien-Immunität einen immunsuppressiven Effekt bei Applikation vor, gleichzeitig mit und nach Beginn der Infektion. Die Übereinstimmung mit unseren Befunden wird bei einem Vergleich des Immunsuppressions-Index deutlich: Tripathy und Mackaness fanden wie wir eine maximale Cyclophosphamid-Wirkung in der Leber bei der Gabe innerhalb von 48 Stunden vor und nach Infektionsbeginn (45).

Demgegenüber ergab sich jedoch eine Abweichung von unseren Befunden nach Anwendung von Cyclophosphamid bei der passiven Zellular-Immunisierung (44). Im Gegensatz zu Asta 5122 konnte eine Cyclophosphamid-Behandlung der Empfänger 24 Stunden vor dem passiven Zelltransfer keine Reduktion der

Immunitätsleistung bewirken. Eine Verabreichung 48 Stunden vor dem passiven Transfer wurde nicht durchgeführt, so daß hierfür kein Vergleich angestellt werden kann.

Die Autoren schließen aus diesem Befund, daß eine Immunsuppression durch Cyclophosphamid ausschließlich auf die Schädigung der immunitätsübertragenden Lymphozyten zurückzuführen sei. Unsere Befunde mit Asta 5122 sprechen im Gegensatz dazu gegen eine isolierte Beeinträchtigung der lymphoiden Zellkomponente durch Asta 5122; sie machen eine zusätzliche Wirkung auf die mononukleär-phagozytäre Komponente wahrscheinlich.

F) Zusammenfassung

Am Modell der experimentellen Listeriose der Maus wurde die Wirksamkeit des neuentwickelten Cyclophosphamid-Derivates 3-(2-Chloräthyl)-2-(2-mesyloxyäthylamino)-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid (Asta 5122) untersucht. Nach 50 mg/kg intraperitoneal zeigte sich, daß die Ausbildung einer aktiven zellulären Anti-Listerien-Immunität unterdrückt wurde, wenn die Behandlung der Versuchstiere gleichzeitig mit, ein und zwei Tage vor und ein bis zwei Tage nach Infektionsbeginn stattfand. Eine einmalige Verabreichung sieben Tage vor dem Antigen-Kontakt hatte keine negative Wirkung auf die antiinfektiöse Immunität zur Folge; im Gegenteil ließ sich ein immunitätsverstärkender Effekt nachweisen.

Bei der passiven Zellular-Immunisierung mit spezifisch reagiblen T-Lymphozyten aus der Milz immuner Spendertiere kam es zu einem Verlust der Immunitätsleistung des passiv immunisierten Empfängers. Eine Behandlung der Spender 24 Stunden vor der Zellübertragung verhinderte ebenfalls die zelluläre antibakterielle Abwehrleistung im Empfänger. Ebenso führte die Empfängerbehandlung 24 oder 48 Stunden vor der Zellularimmunisierung zu einer Herabsetzung der passiv übertragenen Immunität.

Auch im Modell der passiv durch Zellen übertragenen allergischen Reaktion vom verzögerten Typ führte die Asta 5122-Behandlung der Zellempfänger 48 Stunden vor passiver Zellular-Immunisierung und Antigen-Injektion zu einer Minderung der allergischen Hautreaktion gegenüber Listeria-Antigen.

Die Ergebnisse sprechen für eine Schädigung der spezifisch reagiblen T-Lymphozyten und der mononukleären Phagozyten auf Grund der peripheren Zytotoxizität von Asta 5122.

G) Literaturverzeichnis

1. Blanden, R. V., M. J. Lefford and G. B. Mackaness: The host response to Calmette-Guérin Bacillus infection in mice. In: J. Exper. Med. 129 (1969), 1079 - 1101
2. Blanden, R. V.: Mechanisms of recovery from a generalized viral infection: mousepox. I. The effects of anti-thymocyte serum. In: J. Exper. Med. 132 (1970), 1035 - 1054
3. Borel, Y. and R. Schwartz: Inhibition of immediate and delayed hypersensitivity in the rabbit by 6-mercapto-purin. In: J. Immunol., Baltimore, 92 (1964), 754 - 761
4. Botzenhardt, U. und E. - M. Lemmel: Immunsuppression und Toleranzinduktion durch 3-(2-Chloräthyl)-2-(2-mesyloxy-äthylamino)-tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid (ASTA 5122). In: Arzneimittel-Forschung (Drug Res.) 24 (1974), 1167 - 1172
5. Braun-Falco, O.: Cytostatica und Immunsuppressiva in der Dermatologie. In: Der Hautarzt 21 (1970), 391 - 397
6. Brock, N. und H. J. Hohorst: Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. In: Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 13 (1963), 1021 - 1031
7. Brock, N. and H. J. Hohorst: Metabolism of cyclophosphamide. In: Cancer 20 (1967), 900 - 904
8. Brock, N. and J. Kuhlmann: Pharmacological studies with alkylsulfonyloxyalkyl substituted and chlorethyl substituted oxazaphosphorine-2-oxides. 1. Communication: Relationship between chemical structure and pharmacological action. In: Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 24 (1974), 1139 - 1149

9. Brock, N. und J. Potel: Pharmakologische Untersuchungen mit Alkylsulfonyloxyalkyl- bzw. Chloräthyl-substituierten Oxazaphosphorin-2-oxiden. II. Pharmakologische Charakterisierung von 2-Alkylsulfonyloxyalkylamino-oxazaphosphorin-2-oxiden unter Einbeziehung immunologischer Reaktionen. In: Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 24 (1974), 1149 - 1160
10. Cohn, Z. A. and E. Parks: The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. IV. The immunological induction of pinocytic vesicles, secondary lysosomes and hydrolytic enzymes. In: J. Exper. Med. 125 (1967), 1091 - 1104
11. Folb, P. J. and J. R. Trounce: Immunological aspects of Candida infection complicating steroid and immuno suppressive drug therapy. In: The Lancet, London 28 (1970), 1112 - 1114
12. Freund, R., U. Rauer und W. H. Hitzig: Quantitative Immunoglobulin-Bestimmungen im Laufe langdauernder cytostatischer Therapie. In: Mschr. Kinderhk. 117 (1969), 563 - 568
13. Gabrielsen, A. E. and R. A. Good: Chemical suppression of adoptive immunity. In: Adv. Immunol. 6 (1967), 91 - 229
14. Gowans, J. L. and D. D. McGregor: The immunological activities of Lymphocytes. In: Progr. Allergy 2 (1965), 1 - 78
15. Gowans, J. L. and J. W. Uhr: The carriage of immunological memory by small lymphocytes in the rat. In: J. Exper. Med. 124 (1966), 1017 - 1030
16. Hahn, H.: Mechanismus der antibakteriellen Phagozytose. In: Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 22 (1972), 2036 - 2040

17. Hahn, H.: Zelluläre antibakterielle Immunität. In: Dtsch. med. Wschr. 99 (1974), 651 - 656
18. Hahn, H.: Requirement for a bone marrow component in the expression of cell-mediated antibacterial immunity. In: Infection and Immunity (z. Zt. im Druck)
19. Koster, F. T, D. D. McGregor and G. B. Mackaness: The mediator of cellular immunity. II. Migration of immunologically committed lymphocytes into inflammatory exsudates. In: J. Exper. Med. 133 (1971), 400 - 409
20. Lance, E. M.: Immunosuppression. In: Clinical Immunobiology, Ed.: Fritz H. Bach und Robert A. Good, Vol. I Academic Press, New York and London (1972), 193 - 218
21. Lane, F. C. and E. R. Unanue: Requirement of thymus (T) lymphocytes for resistance to Listeriosis. In: J. Exper. Med. 135 (1972), 1104 - 1112
22. Lemmel, E., E. R. Hurd and M. Ziff: Differential effects of 6-mercaptopurine and cyclophosphamide on autoimmune phenomena in NZB-mice. In: Clin. exp. Imm. 8 (1971), 355 - 362
23. Lemmel, E.: Studien über den Wirkungstyp immunsuppressiver Substanzen. In: Habilitationsschrift, Mainz 1973
24. Mackaness, G. B.: Cellular resistance to infection. In: J. Exper. Med. 116 (1962), 381 - 406
25. Mackaness, G. B. and R. V. Blanden: Cellular immunity. In: Progr. Allergy 11 (1967), 89 - 140
26. Mackaness, G. B.: The relationship of delayed hypersensitivity to aquired cellular resistance. In: Brit. Med. Bull. 23 (1967), 52 - 55

27. Mackaness, G. B.: The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. In: J. Exper. Med. 129 (1969), 973 - 992
28. Mackaness, G. B. and W. C. Hill: The effect of antilymphocyte globulin on cell-mediated resistance to infection. In: J. Exper. Med. 129 (1969), 993 - 1012
29. Mauel, J., Biroum-Noerjasin and R. Behin: Killing of intracellular parasites as a measure of macrophage activation. In: Activation of Macrophages, Ed.: W. - H. Wagner and H. Hahn, Vol. 2, Excerpta Medica, Amsterdam (1974), 260 - 266
30. Miki, K. and G. B. Mackaness: The passive transfer of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. In: J. Exper. Med. 120 (1964), 93 - 103
31. Nathan, C. F., M. L. Karnovsky and J. R. David: Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. In: J. Exper. Med. 133 (1971), 1356 - 1376
32. North, R. J., G. B. Mackaness and R. W. Elliot: The histogenesis of immunologically committed lymphocytes. In: Cell. Imm. 4 (1972), 680 - 694
33. North, R. J.: Importance of thymus-derived lymphocytes to cell-mediated immunity to infection. In: Cell. Imm. 7 (1973), 166 - 176
34. Potel, J. und N. Brock: Zur Pharmakologie der chemischen Immunsuppression. In: Zschr. Rheumaforsch. 31 (1972), Suppl. 2
35. Potel, J.: Die immunsuppressive Wirkung von Cytostatica auf die allergische Reaktion vom Spättyp. In: Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 22 (1972), 1658 - 1661

36. Potel, J., K. Pressler und K. H. Ruwisch: Der Einfluß chemischer Immunsuppression auf die Schutzwirkung von Impfungen. In: Zbl. Bakt. Abt. I, Original A, 225 (1973), 416 - 423
37. Rifkind, D.: The activation of varicella-zoster virus infections by immunosuppressive therapy. In: J. Laborat. Clin. Med. 68 (1966), 463 - 474
38. Scheiffarth, F. und H. Warnatz: Langzeitbehandlung von Immunopathien unter Berücksichtigung immunsuppressiver Medikamente. In: Dtsch. med. Wschr. 47 (1969), 2444 - 2449
39. Schwartz, R., J. Stack and W. Dameshek: Effect of 6-mercapto-purine on antibody production. In: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 99 (1958), 164 - 167
40. Schwartz, R., A. Eisner and W. Dameshek: The effect of 6-mercaptipurine on primary and secondary immune responses. In: J. Clin. Invest. 38 (1959), 1394 - 1403
41. Schwartz, R.: Immunsuppressive drugs. In: Progr. Allergy 2 (1965), 246 - 303
42. Sherwood Lawrence, H.: Cellular immunity. In: Clinical Immunobiology, Ed.: Fritz H. Bach and Robert A. Good, Vol. I, Academic Press, New York and London (1972), 47 - 74
43. Sprent, J. and A. Basten: Circulating T- and B-lymphocytes of the mouse. II Lifespan. In: Cell. Imm. 7 (1973), 40 - 59
44. Tripathy, S. P. and G. B. Mackaness: The effect of cytotoxic agents on the passive transfer of cell-mediated immunity. In: J. Exper. Med. 130 (1969), 17 - 30

45. Tripathy, S. P. and G. B. Mackaness: The effect of cytotoxic agents on the primary immune response to *Listeria monocytogenes*. In: J. Exper. Med. 130 (1969), 1 - 16

L e b e n s l a u f

Am 24. März 1951 wurde ich als Tochter des Schlossermeisters Josef Beden und seiner Ehefrau Gerda in Mainz-Kastel geboren. Von 1957 bis 1961 besuchte ich dort die Volksschule, die heutige Gustav-Stresemann-Schule, und wechselte darauf in das Staatliche Frauenlob-Gymnasium in Mainz über. Dort legte ich im Sommer 1969 auf dem naturwissenschaftlich-mathematischen Zweig die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1969 nahm ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz das Studium der Medizin auf. Nach zwei Semestern legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, nach weiteren vier Semestern die medizinische Vorprüfung ab. Zur Zeit bin ich im sechsten klinischen Semester und habe mich zum medizinischen Staatsexamen im Sommer 1975 angemeldet.

